

MICRO CHEMICAL DEVICE

Patent number: JP2002018271
Publication date: 2002-01-22
Inventor: ANAZAWA TAKANORI; TERAMAE ATSUSHI
Applicant: KAWAMURA INST CHEM RES
Classification:
- international: *B01D53/22; B01D61/00; B01J14/00; B01J19/00; C12M1/00; C12Q1/68; G01N27/447; G01N35/02; G01N35/08; G01N37/00; B01D53/22; B01D61/00; B01J14/00; B01J19/00; C12M1/00; C12Q1/68; G01N27/447; G01N35/02; G01N35/08; G01N37/00; (IPC1-7): C12Q1/68; G01N35/08; B01J19/00; B01D53/22; B01D61/00; B01J14/00; C12M1/00; G01N27/447; G01N35/02; G01N37/00*
- european:
Application number: JP20000203651 20000705
Priority number(s): JP20000203651 20000705

Report a data error here

Abstract of JP2002018271

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a micro chemical device not exposing dissolved air in a solution within a liquid flow channel when used in analysis or reaction, reducing a change in the amount of a reaction solution and excellent in reproducibility. **SOLUTION:** In the micro chemical device, a micro flow channel is provided in a member and a pressure reducing channel branched from the flow channel by a water impermeable and air permeable degassing partition wall is provided.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-18271

(P2002-18271A)

(43) 公開日 平成14年1月22日 (2002.1.22)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
B 0 1 J 19/00	3 2 1	B 0 1 J 19/00	Z 2 G 0 5 8
			3 2 1 4 B 0 2 9
B 0 1 D 19/00		B 0 1 D 19/00	H 4 B 0 6 3
53/22		53/22	4 D 0 0 6
61/00		61/00	4 D 0 1 1

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-203651(P2000-203651)

(22) 出願日 平成12年7月5日(2000.7.5)

(71) 出願人 000173751

財団法人川村理化学研究所

千葉県佐倉市坂戸631番地

(72) 発明者 穴澤 孝典

千葉県佐倉市大崎台4-35-4

(72) 発明者 寺前 敦司

千葉県佐倉市大崎台1-20-10-204

(74) 代理人 100088764

弁理士 高橋 勝利

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小ケミカルデバイス

(57) 【要約】

【課題】 本発明が解決しようとする課題は、分析や反応に用いる際に、液流路内で溶液の溶存空気が析出することなく、且つ反応溶液の液量変化の少ない、再現性に優れた微小ケミカルデバイスを提供することにある。

【解決手段】 部材中に微小な流路を有し、水不透過性で且つ気体透過性の脱気隔壁によって流路から分岐された減圧路を有する微小ケミカルデバイス。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 部材中に微小な流路を有し、水不透過性で且つ気体透過性の脱気隔壁によって流路から分岐された減圧路を有する微小ケミカルデバイス。

【請求項2】 流路が、少なくともその1つが室温より高い温度である異なる温度で設定された複数の領域を通して流れることを特徴とする請求項1に記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項3】 異なる温度で設定された複数の領域の中の低い温度領域において、流路から減圧路が分岐されていることを特徴とする請求項1又は2に記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項4】 流路の(断面の幅×高さ)が($1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$)～($1\text{mm} \times 1\text{mm}$)の範囲にある毛細管状流路であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1つに記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項5】 脱気隔壁の酸素透過速度が $8 \times 10^{-13} [\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ 以上であることを特徴とする請求項1～4のいずれか1つに記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項6】 脱気隔壁が疎水性の連通多孔質体で構成されていることを特徴とする請求項5に記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項7】 微小ケミカルデバイスが、表面に溝を有する部材(A)と、部材(A)の溝が形成された面に接着された部材(B)で構成されており、流路が部材(A)の溝と部材(B)とで形成されたものである、請求項1～6のいずれか1つに記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項8】 脱気隔壁が、部材(A)の溝と同じ面に形成された凹部と部材(B)とで形成された空洞部に設けられたものであることを特徴とする請求項7に記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項9】 部材(A)と部材(B)の間に固体状物質(C)が充填された構造を有し、流路が固体状物質(C)の欠損部として形成されたものである請求項7に記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項10】 脱気隔壁が、部材(A)と部材(B)の間に充填された固体状物質(C)の欠損部として形成された空洞部に設けられたものであることを特徴とする請求項7に記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項11】 減圧状態を保持できる減圧室が減圧路に設けられている請求項1～10のいずれか1に記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項12】 微小ケミカルデバイスがマイクロリアクターである請求項1～11のいずれか1に記載の微小ケミカルデバイス。

【請求項13】 マイクロリアクターがPCRデバイスである請求項12に記載の微小ケミカルデバイス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、部材中に微小な流路を有する微小ケミカルデバイス、例えば、化学、生化学などの微小反応デバイス(マイクロリアクター)や、集積型DNA分析デバイス、微小電気泳動デバイス、微小クロマトグラフィーデバイス、微小膜分離デバイス、微小抽出デバイスなどの、化学、生化学、物理化学などの微小分析デバイス等に関する。

【0002】詳しくは、本発明は部材中に微小な流路を有し、該流路内の溶液の脱気の為に水不透過性で且つ気体透過性の脱気隔壁によって流路から分岐された減圧路を有する微小ケミカルデバイスに関し、気泡発生による液切れや、脱気による溶液の蒸発ロスが抑制された、再現性に優れる微小ケミカルデバイス、とりわけ積層された部材で構成され内部に微小な流路を有する微小ケミカルデバイスに関する。

【0003】本発明の微小ケミカルデバイスは、化学、生化学、農業、林業、水産業、医療、食品工業、製薬工業、環境保全、犯罪捜査、スポーツ、その他の広範な分野において使用され、とりわけ、これらの分野に於いて遺伝子解析に利用されるピー・シー・アール(PCR: ポリメラーゼ連鎖反応、以下、PCRと記述する。)デバイスとして有用である。

【0004】

【従来の技術】微小ケミカルデバイスとして、シリコン、石英、ガラス、重合体などの基材に、エッチング法により細い溝を形成して、液体流路や分離用ゲルチャンネルとすることが知られており(例えば、アール・エム・マコーミック等、「アナリティカル・ケミストリー」、第69巻、第2626頁、1997年)、操作中の液体の蒸発防止などを目的として、ガラス板などのカバーをネジ止めなどにより表面に密着させて使用することが知られている。

【0005】しかしながら、このような微小ケミカルデバイスを、特に、室温より高い温度領域で液が流れる構造にして使用すると、反応溶液に溶解していた空気が析出し気泡が生じる場合があり、反応溶液の流速が制御できなくなり、各反応温度帯での滞留時間が変動し、反応効率や再現性が低下する問題が生じていた。そして、このような微小ケミカルデバイスに供給する微量の溶液を脱気し、空気の再溶解を阻止しつつ微小ケミカルデバイスに導入することはかなり困難であった。

【0006】このような微小ケミカルデバイスの一例にPCRデバイスが挙げられる。PCRは、同じ構造のデオキシリボ核酸(DNA、以下、DNAと記述する)の数を増す反応であり、具体的には、反応溶液(増幅すべきDNA断片、ポリメラーゼ、及び基質を含有する緩衝液溶液)を解離温度(約95℃)、会合温度(約45℃)、及び伸長温度(約70℃)を順次経過させるサイクルを繰り返すことにより、DNAを増幅する生化学反

応である。

【0007】PCRは反応溶液を入れた容器(例えば試験管)を上記の温度サイクルで処理するバッチ式の方法が一般的であるが、連続反応方式も知られている。例えば、「サイエンス」(1998年、第282巻、第484頁)には、シリコン、石英、ガラス、ポリマーなどの基材に、エッチング法により細い溝を形成し、ガラス板などのカバーをその表面に接着して、毛細管状の流路を形成した連続反応式PCRデバイスが開示されている。

【0008】このPCRデバイスは、導入口から反応溶液を導入して流路を流す間に、解離部、会合部、及び伸長部の温度領域を順次経由するサイクルを約20回繰り返させるものである。このような微小な連続反応式PCRデバイスでは、解離部において、反応溶液に溶解していた空気が析出して気泡が生じる場合があり、気泡が発生すると各温度帯での滞留時間が変動するために、得られるDNAの増幅効率や再現性が低下する問題が生じていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、分析や反応に用いる際に、液流路内で溶液の溶存空気が析出することなく、且つ反応溶液の液量変化の少ない、再現性に優れた微小ケミカルデバイスを提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、微小な流路を有する微小ケミカルデバイス内に流路内の溶液の脱気隔壁を組み込むことにより、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】即ち、本発明は、(1)部材中に微小な流路を有し、水不透過性で且つ気体透過性の脱気隔壁によって流路から分岐された減圧路を有する微小ケミカルデバイスと、

【0012】(2)流路が、少なくともその1つが室温より高い温度である異なる温度で設定された複数の領域を通して流れることを特徴とする(1)に記載の微小ケミカルデバイスと、

【0013】(3)異なる温度で設定された複数の領域の中の低い温度領域において、流路から減圧路が分岐されていることを特徴とする(1)又は(2)に記載の微小ケミカルデバイスと、

【0014】(4)流路の(断面の幅×高さ)が(1μm×1μm)～(1mm×1mm)の範囲にある毛細管状流路であることを特徴とする(1)～(3)のいずれか1つに記載の微小ケミカルデバイスと、

【0015】(5)脱気隔壁の酸素透過速度が $8 \times 10^{-13} [\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ 以上であることを特徴とする(1)～(4)のいずれか1つに記載の微小ケミカルデバイスと、

【0016】(6)脱気隔壁が疎水性の連通多孔質体で

構成されていることを特徴とする(5)に記載の微小ケミカルデバイスと、

【0017】(7)微小ケミカルデバイスが、表面に溝を有する部材(A)と、部材(A)の溝が形成された面に接着された部材(B)で構成されており、流路が部材(A)の溝と部材(B)とで形成されたものである、

(1)～(6)のいずれか1つに記載の微小ケミカルデバイスと、

【0018】(8)脱気隔壁が、部材(A)の溝と同じ面に形成された凹部と部材(B)とで形成された空洞部に設けられたものであることを特徴とする(7)に記載の微小ケミカルデバイスと、

【0019】(9)部材(A)と部材(B)の間に固体状物質(C)が充填された構造を有し、流路が固体状物質(C)の欠損部として形成されたものである(7)に記載の微小ケミカルデバイスと、

【0020】(10)脱気隔壁が、部材(A)と部材(B)の間に充填された固体状物質(C)の欠損部として形成された空洞部に設けられたものであることを特徴とする(7)に記載の微小ケミカルデバイスと、

【0021】(11)減圧状態を保持できる減圧室が減圧路に設けられている(1)～(10)のいずれか1に記載の微小ケミカルデバイスと、

【0022】(12)微小ケミカルデバイスがマイクロリアクターである(1)～(11)のいずれか1に記載の微小ケミカルデバイスと、及び、

【0023】(13)マイクロリアクターがPCRデバイスである(12)に記載の微小ケミカルデバイスとを含むものである。

【0024】

【発明の実施の形態】本発明の微小ケミカルデバイスの外形は特に限定されず、用途目的に応じた形状を採用する。例えば、フィルム状(シート状、リボン状などを含む。以下同様)、板状、塗膜状、棒状、管状、円筒状、その他複雑な形状の成型物などであり得るが、他の微小ケミカルデバイスとの一体化しやすさ及び成形しやすさの面から、フィルム状又は板状であることが好ましい。本発明の微小ケミカルデバイスは、さらに他の部材と積層や接着することもできる。

【0025】本発明の微小ケミカルデバイスは、デバイス内部に毛細管状の流路を有し、溶液が流路を流れる間に反応や分析などが実施されるように構成されている。なお、本明細書に於いては、流路は液体が流れる空洞部分を意味し、反応場となる流路(反応槽を含む)、バルブ機構部、抽出などの物理化学的処理部、分析部、検出部なども含まれる。

【0026】そして流路は、好ましくは、異なる温度に設定された複数の温度領域を通して流れるべく構成されており、好該複数の温度領域の少なくとも1つは室温より高い温度である。その場合に本発明の効果が特に発揮

される。複数の温度領域の1つは室温であってよい。ここで言う室温とは、本発明の微小ケミカルデバイス稼働時の周囲温度を言う。

【0027】例えば、本発明の微小ケミカルデバイスがPCRデバイスである場合には、流路は、解離部として機能する高温領域（例えば、85～110℃の温度帯で、図2の α で例示される）、会合部として機能する低温領域（例えば、30～60℃の温度帯で、図2の β で例示される）、伸長部として機能する中温領域（例えば、65～85℃の温度帯で、図2の γ で例示される）を経由し、導入部から導入された反応溶液がこの温度の順序で繰り返す温度履歴を経ながら流れ、流出部に至る構造を有する。

【0028】PCRデバイスは、流路を流れる反応溶液が、解離部、会合部、伸長部となる温度帯を好ましくは5～40サイクル、さらに好ましくは15～30サイクル通過するように設計される。流路の長さは、PCRが実現できる長さであれば任意であるが、1～200cmであることが好ましい。

【0029】本発明の微小ケミカルデバイスでは、各温度領域は、デバイス内に温度調節機構、例えば電気ヒーターや温調液体流路を組み込むことにより当該温度に調節されても良いし、微小ケミカルデバイス内には温度調節機構を持たず、外部の機構により当該温度に調節されるものであっても良い。当該温度に調節する外部の機構は任意であるが、例えば、微小ケミカルデバイスの流路部分の外側をしかるべき温度の固体、液体、または気体と接触させる方法、流路部分に赤外線や電磁波などを照射する方法を例示することが出来る。室温とする温度領域は、温度調節機構を必要としない。

【0030】微小ケミカルデバイスの反応溶液の導入部は、微小ケミカルデバイス外に開口していても良いし、直接外部に開口せず、微小ケミカルデバイスに組み込まれた他の機構、例えば迂回機構などに連絡していても良い。流出部もまた、微小ケミカルデバイス外に開口していても良いし、直接外部に開口せず、微小ケミカルデバイスに組み込まれた他の機構、例えば電気泳動カラムなどに連絡していても良い。いずれの場合であっても、導入部は比較的低温領域、好ましくは室温領域、に設けられる。

【0031】本発明の微小ケミカルデバイスの毛細管状の流路の断面寸法は任意であるが、深さが好ましくは1 μ m～3mm、更に好ましくは10 μ m～1mmである。幅は好ましくは1 μ m～3mm、更に好ましくは10 μ m～1mmである。また、断面積は好ましくは1 $\times 10^{-12}$ m²～1 $\times 10^{-6}$ m²であり、更に好ましくは1 $\times 10^{-10}$ m²～1 $\times 10^{-7}$ m²である。

【0032】この寸法より小さい場合、反応溶液の流通速度が低下する傾向にあるので好ましくなく、また、この寸法を超えると、脱気効率が低下する傾向にあるので

好ましくない。本発明の微小ケミカルデバイスの毛細管状の流路の断面寸法は、例えば反応槽部分など、部分的に上記寸法を超える部分があっても良いが、減圧路が分岐している部分、即ち、脱気隔壁と接触している部分の流路の寸法はこの範囲であることが好ましい。

【0033】本発明の微小ケミカルデバイスの流路は、水との接触角が好ましくは35度以下、さらに好ましくは25度以下である。接触角の下限はゼロであって良い。流路の表面の接触角が、流路断面の周の中で異なる場合、例えばその上面、側面、下面で異なる場合には、流路の断面周長の内の、それぞれの接触角を有する部分の重み付き平均とする。好ましくは、上面、側面、下面の全ての面が上記範囲にあるものである。水との接触角が小さいほど、即ち、表面親水性の程度が高いほど、生化学物質の吸着性が低くなる上、脱気が完全でなくても気泡が発生しにくくなる。水との接触角が35度を超えるとその効果に劣ったものとなる。

【0034】なお、本発明の微小ケミカルデバイスにおける流路は微小であるため、その表面の水との接触角を測定することは多くの場合困難である。そのような場合には、流路の表面を構成する素材で他の形状（例えば塗膜状やフィルム状）の成形物を作製し、その表面の接触角の測定値で表すこととする。

【0035】本発明の微小ケミカルデバイス、特にPCRデバイスは、好ましくは、直接または間接的に接着された2つの部材、即ち部材(A)と部材(B)との間に毛細管状の流路が形成されたものである。接着は、部材(A)と部材(B)が直接または間接的に接着されたものであってよい。

【0036】部材(A)の素材は、流路や減圧路がその形状を保持できる硬度と強度を有し、使用する液体や気体を実質的に不透過性である素材であれば任意であり、例えば、有機高分子重合体（以下、単に「重合体」と称する）、ガラス、セラミック、金属、半導体等であってよいが、成形しやすさの面から、重合体であることが好ましい。

【0037】部材(A)に用いられる重合体は、熱可塑性重合体であっても、熱硬化性重合体であっても良いが、成形性の良い熱可塑性重合体、あるいは硬化速度の速いエネルギー線硬化性の重合体为好ましい。エネルギー線硬化性の重合体は、架橋重合体であることが好ましい。部材(A)は、ポリマーブレンドやポリマーアロイで構成されていても良いし、積層体であっても良い。

【0038】部材(A)の素材として好ましく使用できる重合体は、例えば、ポリスチレン、ハイインパクトポリスチレン、ポリ- α -メチルスチレン、ポリスチレン/マレイン酸共重合体、ポリスチレン/アクリロニトリル共重合体の如きスチレン系重合体；ポリスルホン、ポリエーテルスルホンの如きポリスルホン系重合体；ポリメチルメタクリレート、ポリアクリロニトリルの如きポ

リ(メタ)アクリレート系重合体; ポリマレイミド系重合体; ポリカーボネート系重合体;

【0039】酢酸セルロース、メチルセルロースの如きセルロース系重合体; ポリウレタン系重合体; 塩化ビニル、塩化ビニリデンの如き塩素含有重合体; ポリアミド系重合体; ポリイミド系重合体; ポリエチレン、ポリプロピレンの如きポリオレフィン系重合体; ポリフェニレンオキサイド、ポリフェニレンスルフィドの如きポリエーテル系又はポリチオエーテル系重合体; ポリエチレンテレフタレート、ポリアリレートの如きポリエステル系重合体などが挙げられる。

【0040】また、部材(A)に使用できるエネルギー線硬化性の重合体は、(メタ)アクリロイル基を有するエネルギー線硬化性化合物の硬化物や、マレイミド基を有するエネルギー線硬化性化合物の硬化物が好ましい。勿論、重合体は、単独重合体の他、共重合体であっても良い。これらの中でも、スチレン系重合体、(メタ)アクリル系重合体、ポリカーボネート系重合体、ポリスルホン系重合体重合体は、安価で成形性がよく、耐水性や寸法安定性等の物性に優れるため、本発明のPCRデバイスに用いられる部材(A)の素材として特に好適である。

【0041】本発明の好ましい第1の形態に使用される部材(A)は、その表面に流路となるべき溝が設けられている。溝の寸法・形状は、本発明の微小ケミカルデバイスの毛管状の流路と同じにすることが出来る。溝は場所により断面の寸法・形状が異なっても良い。

【0042】部材(A)の表面に溝を設ける方法は任意であり、例えば、射出成型、溶剤キャスト法、溶融レプリカ法、エネルギー線硬化レプリカ法、切削、フォトリソグラフィー(エネルギー線リソグラフィーを含む。以下同様)、エッチング法、蒸着法、気相重合法、溝となるべき部分を切り抜いたシート状部材と板状部材との接着などの方法を利用できる。部材(A)は溝の全体又は一部が表面処理されていても良い。部材(A)には、後述する減圧路の他、溝以外の構造部分、例えば、貯液槽、反応槽、分析機構などとなる構造を設けることができる。

【0043】部材(B)は、流路や減圧路がその形状を保持できる硬度と強度を有し、使用する液体や気体を実質的に不透過性であって、基材上に溝が形成された面に接着し、溝と部材(B)でもって空洞を形成可能なものであれば、その形状、素材、構造、表面状態などは任意である。これらについては、本発明に於ける部材(A)と同様である。部材(B)は表面に溝が形成されている必要は無いが、溝が形成されていても良い。例えば、部材(B)は、表面に溝が形成された部材(A)の鏡像体であってもよい。

【0044】本発明の微小ケミカルデバイスの好ましい第1の形態は、表面に溝が形成された部材(A)の、溝

が形成された面に他の部材(B)が液密に接着され、部材(A)の溝と部材(B)でもって毛細管状の流路が形成されたものである。部材(B)を上側にしたとき、流路の下面と側面は部材(A)、上面は部材(B)で構成されている。但し、部材(B)が、部材(B)の全面に塗布された接着剤で接着されている場合には、上面は接着剤となる。

【0045】部材(A)の表面に直角な方向から見た溝の形状は、本微小ケミカルデバイスの流路の形状とすることが出来る。溝の断面寸法は概ね流路の断面寸法となる。溝の断面形状は任意であり、矩形(角が丸められた矩形を含む。以下同様)、半円等であり得る。

【0046】本発明の好ましい第1の形態に於いて、部材(A)に部材(B)を接着する方法は任意である。例えば、後述のエネルギー線架橋重合性化合物(e)として挙げた化合物を接着剤とし、エネルギー線照射により接着することも好ましい。また、後述する組成物(x)の露光に際し、組成物(x)が完全に硬化しない程度に半硬化させ、未硬化部分を除去後、部材(B)と接触させた。状態でエネルギー線を照射して、組成物(x)を完全硬化させると同時に部材(B)と接着する方法も好ましい。

【0047】本発明の微小ケミカルデバイスの好ましい第2の形態は、部材(A)と部材(B)の間に、毛細管状の流路となる部分を除いて固体状物質(C)が充填されて互いに接着されており、固体状物質(C)の欠損部として、部材(A)と部材(B)との間に毛細管状の流路が形成されたものである。

【0048】この場合は、部材(B)を上側にしたとき、流路の下面が部材(A)、側面は固体状物質(C)、上面は部材(B)で構成されたものとなる。但し[部材(A)と固体状物質(C)]及び/又は[固体状物質(C)と部材(B)]が、それらの全面に塗布された接着剤で接着されている場合には、下面及び/又は上面は該接着剤となる。

【0049】本発明の好ましい第2の形態に於いては、部材(A)は、その表面に溝や凹部が設けられている必要が無いこと以外は、本発明の第1の微小ケミカルデバイスの場合と同様である。

【0050】本発明の好ましい第2の形態に於ける、微小ケミカルデバイスの形成方法は任意であるが、例えば、(ア)部材(A)上に、フォトリソグラフィー等の方法により欠損部を有する固体状物質(C)層を形成し、その上に部材(B)を接着する方法、

【0051】(イ)間隔を置いて設置された部材(A)と部材(B)の間に、活性エネルギー線で硬化して固体状物質(C)となる液状組成物を充填してパターンニング露光により硬化させ、非露光部の未硬化組成物を除去して空洞とする方法、

【0052】(ウ)間隔を置いて設置された部材(A)

と部材(B)の間に、フッ素系樹脂などで形成された流路の型材を置いた状態で、液体状の固体状物質(C)前駆体を充填して硬化させ、その後、型材を除去して空洞とする方法、

【0053】(エ)部材(A)と部材(B)との間に固体状物質(C)で形成された、欠損部を有するフィルム状の部材を挟持し接着する方法などにより実施出来る。

【0054】本発明の第2の微小ケミカルデバイスに於ける固体状物質(C)の充填厚みは流路の高さとしてことができ、本PCRデバイスの全体に渡って一定であっても良いし、場所により異なっても良い。

【0055】固体状物質(C)の素材は任意であり、製造方法により好適なものを使用できるが、活性エネルギー線架橋重合性化合物(e)を含有する活性エネルギー線硬化性の組成物(x)〔以下、「活性エネルギー線架橋重合性化合物(e)を含有する活性エネルギー線硬化性の組成物(x)」を単に「組成物(x)」と略称する〕の硬化物が好適である。

【0056】活性エネルギー線架橋重合性化合物(e)としては、1分子中に2個以上の重合性の炭素-炭素二重結合を有する物が好ましく、末端エチレン基を少なくとも2個含有する重合性不飽和化合物が好ましく、中でも、反応性の高い(メタ)アクリル系化合物〔以下、「(メタ)アクリル」は、「メタクリルまたはアクリル」を意味する。(メタ)アクリレート、(メタ)アクリロイルなどについても同様である。〕やビニルエーテル類、また光重合開始剤の不存在下でも硬化するマレイミド系化合物が好ましい。

【0057】活性エネルギー線架橋重合性化合物(e)として使用できる(メタ)アクリル系モノマーとしては、例えば、ジエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ネオペンチルグリコールジ(メタ)アクリレート、1,6-ヘキサンジオールジ(メタ)アクリレート、2,2'-ビス(4-(メタ)アクリロイルオキシポリエチレンオキシフェニル)プロパン、2,2'-ビス(4-(メタ)アクリロイルオキシポリプロピレンオキシフェニル)プロパン、ヒドロキシジビバリン酸ネオペンチルグリコールジ(メタ)アクリレート、ジシクロペンタニルジアクリレート、ビス(アクロキシエチル)ヒドロキシエチルイソシアヌレート、N-メチレンビスアクリルアミドの如き2官能モノマー；

【0058】トリメチロールプロパントリ(メタ)アクリレート、トリメチロールエタントリ(メタ)アクリレート、トリス(アクロキシエチル)イソシアヌレート、カプロラクトン変性トリス(アクロキシエチル)イソシアヌレートの如き3官能モノマー；ペンタエリスリトールテトラ(メタ)アクリレートの如き4官能モノマー；ジペンタエリスリトールヘキサ(メタ)アクリレートの如き6官能モノマーなどが挙げられる。

【0059】また、活性エネルギー線架橋重合性化合物

(e)として、重合性オリゴマー(プレポリマーと呼ばれる)も用いることもでき、例えば、重量平均分子量が500~50000のものが挙げられる。そのような重合性オリゴマーとしては、例えば、エポキシ樹脂の(メタ)アクリル酸エステル、ポリエーテル樹脂の(メタ)アクリル酸エステル、ポリブタジエン樹脂の(メタ)アクリル酸エステル、分子末端に(メタ)アクリロイル基を有するポリウレタン樹脂などが挙げられる。

【0060】これらの化合物は、単独で用いることもでき、また、2種類以上を混合して用いることもできる。また粘度の調整や接着性を増すなどの目的で、単官能モノマー、例えば、単官能(メタ)アクリル系モノマーを混合することも可能である。

【0061】マレイミド系の架橋重合性モノマーとしては、例えば、4,4'-メチレンビス(N-フェニルマレイミド)、2,3-ビス(2,4,5-トリメチル-3-チエニル)マレイミド、1,2-ビスマレイミドエタン、1,6-ビスマレイミドヘキサン、トリエチレングリコールビスマレイミド、N,N'-m-フェニレンジマレイミド、m-トリレンジマレイミド、N,N'-1,4-フェニレンジマレイミド、N,N'-ジフェニルメタンジマレイミド、

【0062】N,N'-ジフェニルエーテルジマレイミド、N,N'-ジフェニルスルホンジマレイミド、1,4-ビス(マレイミドエチル)-1,4-ジアゾニアビシクロ[2,2,2]オクタンジクロリド、4,4'-イソプロピリデンジフェニル=ジシアナート・N,N'-(メチレンジ-p-フェニレン)ジマレイミドの如き2官能マレイミド；N-(9-アクリジニル)マレイミドの如きマレイミド基とマレイミド基以外の重合性官能基とを有するマレイミドなどが挙げられる。

【0063】マレイミド系の架橋重合性オリゴマーとしては、例えば、ポリテトラメチレングリコールマレイミドカプリエート、ポリテトラメチレングリコールマレイミドアセテートの如きポリテトラメチレングリコールマレイミドアルキレートなどが挙げられる。

【0064】これらのマレイミド系のモノマーやオリゴマーは単独で使用することもでき、2種類以上を混合して用いることもでき、また、例えば、ビニルモノマー、ビニルエーテル類、アクリル系モノマーの如き重合性炭素-炭素二重結合を有する化合物と併用して共重合させることもできる。活性エネルギー線架橋重合性化合物(e)は、複数種の化合物の混合物であり得る。

【0065】活性エネルギー線硬化性の組成物(x)には、必要に応じて、その他の成分を混合して使用することもできる。その他の成分としては、例えば、活性エネルギー線架橋重合性化合物(e)と共重合可能な単官能の重合性化合物、光重合開始剤、重合遅延剤や重合禁止剤、溶剤、増粘剤、改質剤、着色剤などが挙げられる。

【0066】組成物(x)に必要に応じて含有させるこ

との出来る単官能の重合性化合物は、使用する活性エネルギー線架橋重合性化合物(e)と共重合可能なものであれば任意であるが、1分子中に1個以上の重合性炭素-炭素不飽和結合を有する化合物であることが好ましい。単官能の重合性化合物は両親媒性の化合物であることが好ましい。

【0067】両親媒性の化合物とは、分子中に親水基と疎水基を有し、水、疎水性溶媒の両者とそれぞれ相溶する化合物を言う。このような化合物としては、例えば、ノニルフェノキシポリエチレングリコール(n=8~17)(メタ)アクリレート、ノニルフェノキシポリプロピレングリコール(n=8~17)(メタ)アクリレートを挙げることができる。

【0068】組成物(x)に必要な応じて含有させることの出来る光重合開始剤は、本発明で使用する活性エネルギー線に対して活性であり、組成物(x)を硬化させることが可能なものであれば、特に制限はなく、例えば、ラジカル重合開始剤、アニオン重合開始剤、カチオン重合開始剤であって良い。

【0069】そのような光重合開始剤としては、例えば、p-tert-ブチルトリクロロアセトフェノン、2,2'-ジエトキシアセトフェノン、2-ヒドロキシ-2-メチル-1-フェニルプロパン-1-オンの如きアセトフェノン類；ベンゾフェノン、4,4'-ビスジメチルアミノベンゾフェノン、2-クロロチオキサントン、2-メチルチオキサントン、2-エチルチオキサントン、2-イソプロピルチオキサントンの如きケトン類；

【0070】ベンゾイン、ベンゾインメチルエーテル、ベンゾインイソプロピルエーテル、ベンゾインイソブチルエーテルの如きベンゾインエーテル類；ベンジルジメチルケタール、ヒドロキシシクロヘキシルフェニルケトンの如きベンジルケタール類；N-アジドスルフォニルフェニルマレイミドの如きアジドなどが挙げられる。

【0071】また、光重合開始剤として、マレイミド系化合物の如き重合性光重合開始剤を用いることもできる。重合性光重合開始剤は、例えば、エネルギー線架橋重合性化合物として使用できる化合物として例示した多官能マレイミドの如き多官能モノマーの他に、組成物(x)に混合使用できる単官能マレイミド系モノマーとして例示したような単官能モノマーであっても良い。

【0072】組成物(x)に添加する光重合開始剤の使用量は、非重合性光重合開始剤の場合、0.005~20重量%の範囲が好ましく、0.05~5重量%の範囲が特に好ましい。但し、光重合開始剤が重合性光重合開始剤の場合にはこの限りではない。

【0073】組成物(x)に必要な応じて含有させることができる重合遅延剤や重合禁止剤としては、スチレン、 α -メチルスチレン、 α -フェニルスチレン、p-オクタルスチレン、p-(4-ペンチルシクロヘキシル)スチレン、p-フェニルスチレン、p-(p-エ

トキシフェニル)フェニルスチレン、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン、4,4'-ジビニルビフェニル、2-ビニルナフタレン等のエネルギー線硬化性化合物としては重合速度の低いビニル系モノマー；tert-ブチルフェノールなどのヒンダントフェノール類等が挙げられる。

【0074】重合遅延剤や重合禁止剤は、特に細かいパターンを形成する場合に添加することが好ましい。また、エネルギー線として光線を使用する場合には、パターン精度を向上させるために、重合遅延剤及び/又は重合禁止剤と光重合開始剤を併用することが好ましい。

【0075】組成物(x)に必要な応じて含有させることができる溶剤としては、組成物(x)と均一に混合する任意の揮発性の溶剤が挙げられる。組成物(x)に必要な応じて添加することができる増粘剤としては、例えば、ポリスルホン、ポリビニルピロリドン、ポリヒドロキメチルスチレンの如き線状重合体；クレイの如き粉末が挙げられる。組成物(x)に必要な応じて含有させることができる改質剤としては、例えば親水性向上剤として作用するシリカゲル、酸化チタンの如き無機粉末；セルロースの如き有機粉末が挙げられる。

【0076】組成物(x)に必要な応じて含有させることができる着色剤としては、着色剤としての色素や顔料、アントラセンなどの蛍光色素や蛍光顔料、2-ベンゾトリアゾイル-4-メトキシフェノールなどの紫外線吸収剤などが挙げられる。

【0077】本発明の微小ケミカルデバイスの流路、減圧路、及び脱気隔壁が入る凹部や空洞部が、活性エネルギー線によるパターンニング露光と、未照射部の未硬化組成物(x)の除去により作成される場合には、露光後、未照射部の未硬化の組成物(x)が除去される。この除去方法は任意であり、例えば気体による吹き飛ばし、吸引、加圧による押し出し、溶剤洗浄、分解などであり得る。

【0078】本発明の微小ケミカルデバイスは、溶液導入部から、一般的に高温部である反応部(PCRデバイスでは解離部)に至るまでの流路の比較的低温部において、毛細管状の減圧路が分岐されている。比較的低温部とは、本微小ケミカルデバイス内における高温部(解離部)でない部分を言い、好ましくは室温部分である。

【0079】減圧路の分岐点が高温部であると、特に脱気隔壁が疎水性の連通多孔質体で形成されている場合に、溶剤である水の蒸気圧が高い部分で減圧することによる溶剤の蒸発ロスなどの不都合が生じるし、減圧路の分岐点で、溶液が通過する最初の高温部の後であると、減圧路の分岐点に至る前的高温部における気泡の発生が生じる。

【0080】本発明の微小ケミカルデバイスは、高温部に至る手前の比較的低温部の流路から脱気隔壁によって、流路から分岐された脱気用の減圧路を有する。本発

明の微小ケミカルデバイスは該減圧路を利用して流路内の溶液を脱気し反応液中に気泡が発生することを防止して液切れを抑制すると共に、反応液の水蒸発ロスを抑えることにより、反応又は分析の再現性を向上させる利点を有する。

【0081】減圧路の表面の水との接触角は任意であり、減圧路の断面寸法も任意であるが、流路と同程度の断面寸法であることが好ましい。減圧路は減圧可能な任意の構造を有する。例えば、減圧路は微小ケミカルデバイスの外部に連絡する減圧口を有し、減圧口には真空ポンプ、アスピレータ、エジェクタ、減圧された容器その他の減圧手段を接続することが出来る。

【0082】また例えば、本微小ケミカルデバイスと一体化された減圧室（本発明においては、「減圧室」には「減圧容器」を含むものとする）に接続された構造も好ましい。ここで言う減圧室とは、真空ポンプなどによって一旦減圧にすることにより、減圧状態を保持出来る空間または容器のことである。

【0083】本発明の微小ケミカルデバイスは極めて微小な寸法に形成可能であるため、小容量の減圧室を使用して、微小ケミカルデバイスに直接、真空ポンプを接続することなく、反応溶液の脱気を実施できる。減圧室の容積は任意であるが、好ましくは $1 \times 10^{-15} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ であり、更に好ましくは $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ m}^3$ である。流路の断面積が小さいほど、また、流路の長さが短いほど、減圧室の容積を小さくすることが出来る。

【0084】減圧路の形状や構造も任意であるが、①部材(A)または部材(B)を貫通する構造であること、②本発明の好ましい第1の形態に於いては、部材(A)の流路となる溝が形成された同じ面に減圧路となる溝を形成することにより、部材(A)の溝と部材(B)との間に形成された構造であること、又は、③本発明の好ましい第2の形態に於いては、固体状物質(C)の欠損部として、流路と同じ平面内に形成された構造であること、が製造が容易であり好ましい。

【0085】また④本発明の好ましい第1の形態に於いて、脱気隔壁が部材(A)と部材(B)の間に気密に挟持された状態に形成される場合や、⑤好ましい第2の形態に於いて、脱気隔壁が固体状物質(C)と部材(B)との間に気密に挟持された状態に形成される場合には、部材(B)に形成された溝状であることが好ましい。

【0086】前記のように、本発明の微小ケミカルデバイスにおける脱気隔壁は、流路から減圧路が分岐する位置に設けられており、脱気隔壁の一方の面が流路に面しており、他方の面が減圧路に面している。しかしながら、減圧路内に多くの溶液が滞留しない範囲で、やや減圧路側に入った位置に脱気隔壁を設けることは差し支えない。

【0087】脱気隔壁の形状や構造は任意であるが、特

に脱気隔壁が連通多孔質体で形成されたものである場合には、①部材(B)の、部材(A)または固体状物質(C)との接触面に設けられた凹部内に形成されていること、②本発明の好ましい第1の形態に於いては、部材(A)の流路となる溝が形成された同じ面に形成された凹部内に設けられることにより、部材(A)の溝と部材(B)との間に形成されること、又は③本発明の好ましい第2の形態に於いては、固体状物質(C)の欠損部として形成された空洞内に設けられること、が製造が容易であり好ましい。

【0088】また、特に脱気隔壁が連通細孔を有しないものである場合には、④本発明の好ましい第1の形態に於いては、部材(A)と部材(B)の間に、流路となる溝に接して気密に挟持された状態に形成されること、⑤好ましい第2の形態に於いては、固体状物質(C)と部材(B)との間に、流路となる空洞部に接して気密に挟持された状態に形成されることも好ましい。

【0089】脱気隔壁は気体透過性である。即ち、反応液に溶解している気体を脱気隔壁を通して除去することが出来る。脱気隔壁の流路との、流路長さ方向の接触長は任意であるが、流路幅の2倍以上であることが好ましく、10倍以上であることがさらに好ましい。接触長の上限も任意であるが、微小ケミカルデバイスの全流路長の $1/2$ 以下であることが好ましい。脱気隔壁の酸素透過速度が低いほど、接触長を大きくすることが好ましい。

【0090】本発明の微小ケミカルデバイスは、好ましくは、脱気隔壁と接触している流路部分において、流路断面の周の一部分が脱気隔壁と接触している。さらに、脱気隔壁と接触している流路周長は、脱気隔壁との接触部以外の流路部分の流路周長より小さい。即ち、脱気隔壁との接触部分で流路表面積を広げる必要がない。このような構造とすることで、微小スケールの脱気機構として十分な性能を持たせながら容易に製造することが出来る。この部分において、既知の大スケールの隔膜脱気装置と異なる。

【0091】脱気隔壁が気体透過性であるとは、脱気隔壁の酸素透過速度が $8 \times 10^{-13} [\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ 以上であることを言う。また酸素透過速度とは、単位面積(m^2)当たり、単位時間(s)当たり、及び単位圧力差(Pa)当たりの透過酸素体積 $[\text{m}^3 (0^\circ\text{C}, 100\text{kPa})]$ を言う。測定温度は 25°C とする。酸素透過速度は $8 \times 10^{-12} [\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ 以上であることが好ましく、 $8 \times 10^{-11} [\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ 以上であることが更に好ましい。

【0092】酸素透過速度の上限は、自ずと限界はあるが、高いことそれ自体による不都合は無いため、限定する必要はない。酸素透過係数の小さい素材を用いる場合には、厚みを薄くしたり、不均質膜や複合膜とすることで、上記の酸素透過速度定数とすることが出来る。本

発明に用いることの出来る脱気隔壁の酸素透過速度定数は、通常のスケールの脱気モジュールに使用される脱気膜に比べて小さな値で脱気が可能である。

【0093】脱気隔壁が連通多孔質体で構成されている場合は、酸素透過速度は、好ましくは $8 \times 10^{-10} [\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}] \sim 8 \times 10^{-6} [\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ である。この場合には、酸素透過速度定数が過大であると、水不透過の耐圧性が低下しがちである。

【0094】気体透過性の隔壁び使用できる素材としては、隔壁が非多孔質体である場合には、酸素透過係数が $8 \times 10^{-18} [\text{m}^3 \cdot \text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ 以上である素材、例えば、シリコン樹脂、ポリアセチレン系樹脂、ポリイミド系樹脂、フッ素系樹脂、ポリ-4-メチル-1-ペンテンなどのポリオレフィン系樹脂、を挙げることができる。気体透過性の隔壁は、その他に疎水性の連通多孔質体を用いることが出来る。脱気隔壁が疎水性の連通多孔質体である場合には、多孔質体自体の酸素透過速度定数が上記の範囲にあることが必要であって、多孔質体を構成する素材の酸素透過係数は任意である。

【0095】脱気隔壁は、微小ケミカルデバイスの使用条件において、溶液を透過させないことが必要である。そのため、該隔壁は水不透過性、即ち、液体状態の水を透過させないものである。液体状態の水を透過させないためには、該隔壁は表裏を連通する細孔を有しないものであるか、疎水性の細孔表面を有する連通多孔質体である必要がある。表裏を連通する細孔を有しないものとしては、例えば、シリコンゴム、ポリアセチレン、ポリイミド、ポリ-4-メチル-1-ペンテンなどの任意の気体透過性の素材で構成されたフィルム、不均質膜、複合膜、独立気泡膜等であり得る。

【0096】本発明の微小ケミカルデバイスにおいては、脱気隔壁が水不透過性であっても、素性機の透過が過大であれば、反応溶液の減少や濃度変化などの重大な不都合をもたらす場合がある。そのため、脱気隔壁は水蒸気透過速度定数の小さいものであることが好ましいが、脱気の際の減圧度を制御することにより、流路内溶液の水の蒸発を最小限にとどめることも出来る。

【0097】例えば、脱気隔壁として、表裏を連通する細孔を有しないものを使用する場合には真空度を高く（圧力を低く）することが可能であり、場合によっては、水の蒸気圧より低い圧力で運転することも可能である。しかしながら、隔壁に多孔質膜を使用する場合には、反応溶液の水が蒸発し易いため、減圧路の圧力は、 $10 \sim 50 \text{ kPa}$ とすることが好ましい。なお、本発明の脱気隔壁は、流路内の溶液にとっては圧力隔壁として作用するため、減圧路を減圧しても反応溶液の液体圧力には影響しない。

【0098】脱気隔壁は、疎水性の素材で形成された連通多孔質体、即ち、多数の細孔が脱気隔壁の一方の面か

ら他の面に連通した多孔質体で構成されていることが、製造が容易であり、微小な寸法の脱気隔壁で機能を発揮できるため好ましい。（以下、「疎水性の連通多孔質体」を単に「多孔質体」と略称する場合がある。また、「疎水性の連通多孔質体で構成された脱気隔壁」を単に「多孔質脱気隔壁」と略称する場合がある。）

【0099】多孔質体の細孔形状は任意であり、例えば、焼結体状（凝集粒子状）、海绵状（3次元網目状）、汙紙や不織布、織布、束状繊維の間隙、並列に形成された複数の毛細管やスリット等であり得る。並列に形成された複数の毛細管やスリット（以下、この「凹部や毛細管やスリット」を「毛細管等」と称する場合がある。）は、概ね平行に形成された毛細管等の他、相互に交差・連絡した毛細管等であってよく、例えば、2次元格子状、X状に交差した複数の概平行な形状、乱れた2次元格子状、2次元網目状であり得る。

【0100】細孔の孔径は、多孔質体の疎水性の程度と関連するが、減圧により反応溶液が多孔質体を透過しない程度の孔径であれば任意である。多孔質体の疎水性の程度、即ち、細孔表面の疎水性の程度が高いほど、孔径は大きいても良い。多孔質部の細孔の孔径や毛細管等の径は、好ましくは孔径が $0.001 \mu\text{m} \sim 2 \mu\text{m}$ 、更に好ましくは $0.05 \mu\text{m} \sim 0.7 \mu\text{m}$ である。

【0101】多孔質体の細孔の孔径は、同じ断面積を有する円管の直径を言う。ここで言う孔径は、表裏を連通する細孔中の最大の孔径である。多孔質体の細孔形状や孔径は、例えば走査型電子顕微鏡（SEM）観察から、ある程度推定できるが、正確な値を決定することは困難である。孔径の最も好適な判別方法は、水の透過圧力（差）の測定である。本発明の多孔質体は、水の透過圧力（差）が 30 kPa 以上のものであることが好ましい。

【0102】疎水性の素材で形成された連通多孔質体とは、多孔質体を構成する素材の、水との接触角が概ね 90 度以上である連通多孔質体を言う。PCR反応溶液は塩を含有する緩衝液であるため、通常、この反応溶液との接触角は水との接触角より大である。従って、水との接触角が 90 度より若干低くても使用可能な場合もあるが、安定性の面から、 90 度以上であることが好ましい。疎水性の多孔質体を形成することは、疎水性の素材を使用する、細孔表面を表面処理する、等の方法により実施できる。

【0103】多孔質体の素材は、水との接触角が概ね 90 度以上であれば任意であるが、重合体で形成されていることが、製造が容易であり好ましく、活性エネルギー線架橋重合性化合物（f）を含有する架橋重合体であることが、製造が容易であり、特に好ましい。該架橋重合体は、活性エネルギー線架橋重合性化合物（f）の単独重合体又はそれを含有する共重合体であり得る。活性エネルギー線架橋重合性化合物（f）は、本発明で用いら

れる活性エネルギー線架橋重合性化合物 (e) と同様である。

【0104】脱気隔壁を微小ケミカルデバイス中に設ける方法は任意であるが、脱気隔壁が多孔質脱気隔壁である場合には、活性エネルギー線を用いたパターンニング法により、必要部位に形成する方法が好ましい。活性エネルギー線を用いて、必要部位に多孔質脱気隔壁を形成する方法としては、

【0105】(i) 活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) (及び、それと単官能の重合性化合物と共重合させる場合には、該単官能化合物も。以下同様。) を溶解するが、活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) の硬化物 (または、それと単官能の重合性化合物と共重合させる場合には、該共重合体。以下同様。) を溶解または膨潤させない相分離剤を含有する組成物 (y) を、多孔質脱気隔壁を形成する部分に充填し、

【0106】(ii) 多孔質脱気隔壁と成す部分に活性エネルギー線を照射し、活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) を重合硬化させると同時に相分離剤と相分離させて、連通多孔質からなる隔壁を形成させ、(iii) 未照射部の未硬化の組成物 (y)、及び形成された多孔質脱気隔壁の細孔に充填された相分離剤を除去することにより製造することが出来る。

【0107】即ち、本発明の好ましい第1の形態の場合には、例えば、(i') 流路となる溝、減圧路となる溝、及び多孔質脱気隔壁が形成される凹部が形成された部材 (A) の凹部に組成物 (y) を充填し、(ii') 該凹部内の、流路と減圧路に分割する隔壁となる部分に活性エネルギー線を照射して、活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) を硬化させると同時に相分離剤と相分離させて、連通多孔質からなる隔壁を形成させ、

【0108】(iii') 未照射部の未硬化の組成物 (y)、及び形成された多孔質脱気隔壁の細孔に充填された相分離剤を溶剤にて洗浄除去し、次いで、(iv') 部材 (B) を溝及び隔壁が設けられた面に接することにより、製造する方法を例示できる。

【0109】また、本発明の好ましい第2の形態の場合には、例えば、(i'') 部材 (A) と部材 (B) との間に固体状物質 (C) が挟持されており、該固定状物質 (C) の欠損部として、流路、減圧路、及び多孔質脱気隔壁形成部分となる空洞部が形成された部材の空洞部に、組成物 (y) を充填し、

【0110】(ii'') 該空洞部内の、流路と減圧路を分割する隔壁となる部分に活性エネルギー線を照射して、活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) を硬化させると同時に相分離剤と相分離させて、連通多孔質からなる隔壁を形成させ、(iii'') 未硬化の組成物 (y)、及び形成された多孔質脱気隔壁の細孔に充填された相分離剤を吸引及び/又は溶剤洗浄にて除去することにより、製造する方法を例示できる。

【0111】相分離剤は、活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) と相溶し、かつこの活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) が活性エネルギー線の照射を受けることにより生成する重合体を溶解又はゲル化させず、しかも活性エネルギー線に対して不活性なものであれば、いかなるものでもよい。また、「活性エネルギー線に対して不活性」とは、使用する活性エネルギー線により、重合、分解、活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) との反応などを生じてその性質が無視し得ない程度に変化することがないことを言う。この場合、ごく部分的な架橋、分解、反応などが生じることが許容される。

【0112】相分離剤と活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) とは、活性エネルギー線照射時において実質的に相溶している必要がある。相分離状態で活性エネルギー線を照射すると、連通多孔質脱気隔壁が形成されない。しかしながら、完全に相溶している必要はなく、多少の不溶部分があっても良い。

【0113】相分離剤と活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) との相溶性は、活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) の種類によって異なる。例えば、活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) として、重合性オリゴマーである分子末端に (メタ) アクリロイル基を有するポリウレタンを用いる場合には、相分離剤 (b) として、カプリン酸メチル、カプリン酸エチル、ラウリン酸メチル、カプリル酸メチル、カプリル酸エチル、アジピン酸ジイソブチルなどのアルキルエステル類、

【0114】ジイソブチルケトンなどのジアルキルケトン類、アルコール類、ポリエチレングリコールエステル類、グリセリンのトリエステル、アルキルエーテル類、その他の界面活性剤等を好適に用いることができ、中でもアルキルエステル類が特に好ましい。

【0115】また、相分離剤は、液状の活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) に溶解し、活性エネルギー線照射に対し不活性なものであれば、例えば、重合体の如き固体であってもよい。そのような相分離剤 (b) としては、例えば、パラフィン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリウレタン、ポリアクリロニトリル、ポリ (メタ) アクリル酸エステル、ポリ (メタ) アクリル酸、ポリメチルメタクリレート、ポリアクリルアミド、及びこれらの誘導体や共重合体が挙げられる。

【0116】相分離剤として用いられる重合体は複数の重合体であって、また、重合体溶液であってもよい。更に、相分離剤は単一組成であってもよいし、混合物であってもよい。混合物の場合には、その混合物が本発明に用いる活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) と相溶し、且つ、この活性エネルギー線架橋重合性化合物 (f) が活性エネルギー線の照射を受けることにより生成する重合体を溶解せず、しかも活性エネルギー線に対して不活性なものであれば如何なるものでもよく、その

構成成分単独での性状は特に限定されない。

【0117】従って、混合物中の個々の構成成分は、活性エネルギー線架橋重合性化合物(f)と相溶しないものであってもよいし、活性エネルギー線架橋重合性化合物(f)から生成する重合体を溶解又は膨潤させるものであってもよい。

【0118】相分離剤の使用割合は、活性エネルギー線架橋重合性化合物(f)1重量部に対して、0.1~5重量部の範囲が好ましく、0.5~3重量部の範囲が更に好ましい。この範囲より低いと多孔質体の空隙率が低くなり過ぎ、この範囲より高いと空隙率が高くなり過ぎて強度が不十分となる傾向にあるので好ましくない。

【0119】組成物(y)には、必要に応じて、その他の成分を混合して使用することもできる。その他の成分としては、例えば、活性エネルギー線架橋重合性化合物(f)と共重合可能な単官能の重合性化合物、光重合開始剤、重合遅延剤や重合禁止剤、溶剤、増粘剤、改質剤、着色剤などが挙げられる。

【0120】組成物(y)に必要なに応じて含有させることの出来る単官能の重合性化合物は、使用する活性エネルギー線架橋重合性化合物(e)と共重合可能なものであれば任意であるが、1分子中に1個以上の重合性炭素-炭素不飽和結合を有する化合物であることが好ましい。

【0121】活性エネルギー線架橋重合性化合物(f)として、その単独重合体が水との接触角が90度に満たないものを用いる場合は、単官能の重合性化合物に疎水性の高い化合物を使用することにより、その共重合体を疎水性にすることが出来る。疎水性の高い単官能の重合性化合物としては、長鎖アルキル(メタ)アクリレート、フッ素含有(メタ)アクリレート、珪素含有(メタ)アクリレートを例示することができる。

【0122】組成物(y)に必要なに応じて含有させることの出来る光重合開始剤、重合遅延剤や重合禁止剤、溶剤、増粘剤、改質剤、着色剤については、本発明で利用できる組成物(x)の場合と同様である。

【0123】活性エネルギー線としては、組成物(y)を硬化させることが可能なものであれば任意であり、紫外線、可視光線、赤外線、エックス線、ガンマ線、放射光などの電磁波；電子線、ベータ線、重粒子線などの粒子線等が挙げられるが、取り扱い性や硬化速度の面から紫外線、可視光、電子線が好ましく、紫外線が特に好ましい。紫外線はレーザー光であることも好ましい。

【0124】また、硬化速度を速め、硬化を完全に行う目的で、活性エネルギー線の照射を低酸素濃度雰囲気で行うことが好ましい。低酸素濃度雰囲気としては、窒素気流中、二酸化炭素気流中、アルゴン気流中、真空又は減圧雰囲気が好ましい。

【0125】多孔質脱気隔壁となる部分に活性エネルギー線を照射する方法は任意であり、例えば、照射不要部

分をフォトマスクングして照射する方法、あるいは活性エネルギー線のビームを走査する方法等のフォトリソグラフィの手法が利用できる。活性エネルギー線は、部材(A)の表面に直角な方向から照射することが好ましいが、必ずしも正確に直角である必要はない。また、部材(A)側から部材(A)を通して照射することもできる。

【0126】未照射部の未硬化の組成物(y)、及び形成された多孔質脱気隔壁の細孔に充填された相分離剤の除去方法は、本発明の微小ケミカルデバイスの流路、減圧室、多孔質脱気隔壁が形成される凹部や空洞部が、活性エネルギー線によるパターンニング露光と、未照射部の未硬化の組成物(x)の除去により行われる場合の、未硬化の組成物(x)の除去方法と同様である。

【0127】本発明の微小ケミカルデバイスは、デバイス内に、流路、温調機構、減圧室以外の機構、例えば、貯液槽、電気的あるいは光学的などの検出機構、バルブ駆動用流体流路、などを設けることもできるし、他のデバイスと一体化することも可能である。

【0128】

【実施例】以下、実施例を用いて、本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例の範囲に限定されるものではない。なお、以下の実施例において、「部」及び「%」は、特に断りが無い限り、各々「重量部」及び「重量%」を表わす。

【0129】〔エネルギー線照射装置〕200wメタルハライドランプが組み込まれた、ウシオ電機株式会社製のマルチライト200型露光装置用光源ユニットを用いた。紫外線強度は100mw/cm²である。

【0130】〔測定方法〕実施例中の測定は次の方法により行った。

〔水接触角の測定〕試料を25℃、湿度60%に24時間静置した後、協和界面科学製接触角度計CA-X型を使用し、室温(24±2℃)にて、安定化時間3分で測定した。

【0131】〔多孔質体の孔径の観察〕PCRデバイスを破壊して多孔質脱気隔壁を取り出し、その断面を日立製作所製800型の走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。

【0132】〔組成物(x)の調製〕

〔組成物(x-1)〕活性エネルギー線架橋重合性化合物(e)として、平均分子量約2000の3官能ウレタンアクリレートオリゴマー(大日本インキ化学工業株式会社製の「ユニディックV-4263」；単独重合体の水との接触角は72度)を20部、及び1,6-ヘキサジオールジアクリレート(第一工業製薬株式会社製の「ニューフロンティアHDDA」；単独重合体の水との接触角は84度)を20部、

【0133】単官能の重合性化合物としてノニルフェノキシポリエチレングリコール(n=8)アクリレート

(東亜合成化学株式会社製の「M-114」; HLB値=11.25; 水、シクロヘキサン/トルエン混合溶媒の両者に可溶)を60部、光重合開始剤として1-ヒドロキシシクロヘキシルフェニルケトン(チバガイギー社製の「イルガキュア184」)を5部、及び重合遅延剤として2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン(関東化学株式会社製)0.1部を均一に混合して組成物(x-1)を調製した。

【0134】〔組成物(y)の調製〕

〔組成物(y-1)の調製〕活性エネルギー線架橋重合性化合物(f)としてエチレンオキシド変性ビスフェノールAジアクリレート(第一工業製薬株式会社製の「ニューフロンティアBPE-4」; 単体重合体の水との接触角は68度)を40部、単官能の重合性化合物としてテトラフルオロプロピルアクリレート(大阪有機化学工業株式会社製の「ビスコート4F」)0.1部、相分離剤(b)としてカプリン酸メチル(関東化学社製)60部、及び紫外線重合開始剤として1-ヒドロキシシクロヘキシルフェニルケトン(チバガイギー社製の「イルガキュア184」)を5部を混合して組成物(y-1)を調製した。

【0135】〔実施例1〕本実施例では、表面に溝と凹部が形成された部材(A)と他の部材(B)との間に流路、減圧路、及び多孔質脱気隔壁が設けられたPCR用微小ケミカルデバイスの製造例を示した。

【0136】〔微小ケミカルデバイスの作製〕

〔部材(A)の作製〕ポリスチレン(大日本インキ化学工業社製の「ディックスチレン XC-520」)製の5cm×5cm×3mmの板を、シリコンウェハー製の鋳型と密着させてガラス板に挟み、バネ式クランプで止めて、120℃の熱風炉中に2時間静置した後、取り出して自然放冷し、鋳型を剥離して、図1に示された形状の、幅100μm、深さ80μm、長さ1.5mの流路となる溝(2)、幅100μm、深さ80μm、長さ5mの減圧路となる溝(3)、及び幅3mm、長さ1mm、深さ80μmの凹部(4)を有する部材(A)(1)を得た。

【0137】〔脱気隔壁の作製〕部材(A)(1)の、凹部(4)、及びその付近の減圧路となる溝(3)、及び流路となる溝(2)に組成物(y-1)を、表面に盛り上がる程度に注入し、フォトマスクを用いて、凹部(4)部分のみに紫外線を10秒間照射した後、石油エーテルにて未硬化の組成物(y-1)及び形成された脱気隔壁(4')の細孔に充填された相分離剤を洗浄除去して、凹部(4)全体を充填する形状に脱気隔壁(4')を形成した。

【0138】〔部材(B)の接着〕ポリスチレン(大日本インキ化学工業社製の「ディックスチレン XC-520」)製の5cm×5cm×3mmの板(8)に、127μmのバーコーターを用いて、組成物(x-1)を

接着剤として塗布し、上で用いたと同じ紫外線を、フォトマスク無しで1秒間照射して塗膜を半硬化させ、その状態で部材(A)と密着させて、紫外線をさらに30秒間照射して、両部材を硬化した接着剤層(9)を介して接着した。ポリスチレン板(8)と接着剤層(9)を併せて部材(B)とした。

【0139】〔接続口の形成〕部材(B)の、導入部(5)に相当する位置に1.6mmのドリルにて穴を穿ち、その部分に直径1.6mmのステンレスパイプを接着して、導入口(10)を形成した。同様に部材(B)の、流出部(6)に相当する位置に流出口(11)を形成した。さらに、減圧路の端(7)にも同様に、減圧口(12)を形成し、図2及び図3に示された形状の20サイクルのPCR用微小ケミカルデバイス(#1)を得た。

【0140】〔試験〕

(使用試験)得られた微小ケミカルデバイス(#1)の導入口(10)から、約10kPa(ゲージ圧)の圧をかけて蒸留水を流入させたところ、蒸留水は流路(2')を流れて流出口(11)より流出した。その状態のまま、減圧口(12)に真空ポンプを接続して、圧力約20kPa(即ち、隔壁両側の圧力差は約90kPa)に減圧したが、蒸留水は脱気隔壁(4')を透過することはなかった。さらに、その状態で、図2の仮想線で囲まれた領域αを、95℃に調節された金属に接触させ、接触面の反対側に約1mmの間隙をあけて厚さ3mmの透明アクリル板を設置したが、流路(2')中に気泡が発生することはなかった。

【0141】〔確認試験〕

〔T-1〕脱気隔壁の流通試験

微小ケミカルデバイス(#1)に、蒸留水の代わりにエタノールを導入し、減圧口(12)を同様にして減圧したところ、エタノールは脱気隔壁(4')を透過した。このことから、脱気隔壁(4')は連通多孔質体で形成されていることがわかる。

【0142】〔T-2〕脱気隔壁の酸素透過速度

流出口(11)を閉じ、減圧口(12)にゲージ圧100kPaの酸素ガスを接続し、導入口(10)から流出する酸素ガス(大気圧)の流量を測定して算出した多孔質隔膜の酸素透過速度は、 $1.6 \times 10^{-8} [\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ であった。

【0143】〔T-3〕孔径の観察

これらの試験の終了後に本PCR用微小ケミカルデバイスを破壊して脱気隔壁(4')を取り出し、その断面をSEMにて観察したところ、この脱気隔壁は、孔径約0.5μmの多数の細孔を有する多孔質体であることが確認された。

【0144】〔T-4〕流路を構成する素材の水との接触角

組成物(x-1)を127μmのバーコーターを用いて

ガラス板に塗布し、紫外線を30秒間照射して硬化塗膜を得た。この塗膜の水との接触角は22度であった。

【0145】〔T-5〕脱気隔壁を構成する素材の水との接触角

相分離剤を含有しないこと以外は組成物(y-1)と同様の組成物を調製し、これを127 μ mのバーコーターを用いてガラス板に塗布し、紫外線を30秒間照射して硬化塗膜を得た。この塗膜の水との接触角は108度であった。

【0146】〔比較例1〕

〔微小ケミカルデバイスの作製〕減圧路(3')、空洞部(4')、及び脱気隔壁(4')を設けなかったこと以外は実施例1と同様にしてPCR用微小ケミカルデバイス(#C1)を作製した。

【0147】〔使用試験〕得られた微小ケミカルデバイス(#C1)の導入口(10)から、実施例1と同じ圧をかけて蒸留水を流入させたところ、蒸留水は流路(2')を流れて流出口(11)より流出した。その状態で、図2の仮想線で示された領域 α を、95℃に調節された金属に接触させたところ、流路中に気泡が発生し、反応溶液が途切れる現象が生じた。

【0148】〔実施例2〕本実施例では、部材(A)と部材(B)との間に固体状物質(C)が充填されており、該固体状物質(C)の欠損部として、流路、減圧路、及び多孔質脱気隔壁が設けられたPCR用微小ケミカルデバイスの製造例を示した。

【0149】〔微小ケミカルデバイスの作製〕

〔部材(A)の作製〕ポリスチレン(大日本インキ化学工業社製の「ディックスチレン XC-520」)製の5cm×5cm×3mmの板に、127 μ mのバーコーターを用いて組成物(x-1)を塗布し、100mw/cm²の紫外線を3秒間照射して、塗膜(13)を半硬化させ、部材(A)(1)とした。

【0150】〔固体状物質(C)層の形成〕この半硬化塗膜の上に、127 μ mのバーコーターを用いて組成物(x-1)を塗布し、フォトマスクを使用して、図1に示された、流路となる溝(2)、減圧路となる溝

(3)、及び凹部(4)以外の部分に、100mw/cm²の紫外線を3秒間照射して、照射部分の塗膜を半硬化させた後、エタノールにて未照射部の未硬化の組成物(x-1)を洗浄除去し、図1に示された形状の、幅200 μ m、深さ97 μ m、長さ1.5mの流路となる溝(2)、幅200 μ m、深さ97 μ m、長さ5mmの減圧路となる溝(3)、及び幅3mm、長さ1mm、深さ97 μ mの凹部(4)が樹脂欠損部として形成された固体状物質(C)層〔図4に示す(14)〕を形成した。

【0151】〔部材(B)の接着〕ポリスチレン(大日本インキ化学工業社製の「ディックスチレン XC-520」)製の5cm×5cm×3mmの板(8)を部材(B)として使用し、これに127 μ mのバーコーター

を用いて、組成物(x-1)を塗布し、上で用いたと同じ紫外線をフォトマスク無しで1秒間照射し、塗膜(9)を半硬化させ、その状態で固体状物質(C)層(14)と密着させて、紫外線をさらに30秒間照射し、固体状物質(C)層(14)の上に接着剤層(9)を介して部材(B)(8)を接着した。

【0152】〔接続口の形成〕部材(B)(8)の、導入部(5)に相当する位置に、1.6mmのドリルにて穴を穿ち、その部分に直径1.6mmのステンレスパイプを接着して、導入口(10)を形成した。同様にして部材(B)(8)の、流路の流出部(6)に流出口(11)を形成した。さらに、減圧路の端(7)にも同様にして、減圧口(12)を形成した。

【0153】〔脱気隔壁の作製〕導入口(10)から組成物(y-1)を導入し、流路(2')、減圧路(3')、及び脱気隔壁が設けられる空洞部(4')に組成物(y-1)を充填し、部材(A)(1)側から、フォトマスクを用いて、空洞部(4')に紫外線を10秒間照射した後、流入口(10)から未硬化の組成物(y-1)及び相分離した相分離剤を吸引除去し、さらに流路(2')と脱気隔壁(4')に石油エーテルを流通させて洗浄して、空洞部(4')全体を充填する形状に脱気隔壁(4')を形成し、PCR用微小ケミカルデバイス(#2)を得た。PCR用微小ケミカルデバイスの立面図の模式図を図4に示す。

【0154】〔試験〕

〔使用試験〕得られた微小ケミカルデバイス(#2)を用いて、実施例1と同様の使用試験を行い、同様の結果を得た。

【0155】〔PCR用反応溶液の調製〕鋳型プラスミドDNA:4.0 μ l、ポリメラーゼ〔宝酒造株式会社製「Takara Ex Taq TM」〕:2.0 μ l、緩衝液〔宝酒造株式会社製「10X Ex Taq TM Buffer」〕:8.0 μ l、基質〔宝酒造株式会社製「dNTP Mixture (2.5mM each)」〕:6.4 μ l、プライマー〔宝酒造株式会社製「Fluorescein-Labeled Primer M4 (1pmol/ μ l)」〕:20 μ l、プライマー〔宝酒造株式会社製「Fluorescein-Labeled Primer RV-M (1pmol/ μ l)」〕:20 μ l、及び滅菌蒸留水:19.6 μ lを混合して、反応溶液を調製した。

【0156】〔PCR試験〕図2の領域 α 、領域 β 、領域 γ を各々95℃、45℃、75℃に温調した金属に接触させ、接触面の反対側に約1mmの間隙をあけて厚さ3mmの透明アクリル板を設置したこと、蒸留水の代わりに反応溶液を滞留時間20分となる流量で40分間流したこと以外は上記使用試験と同様にしてPCR試験を行った。反応中、気泡の発生は認められなかった。流出口(11)より流出した反応溶液を採取し、電気泳動分析にかけたところ、DNAが増幅されていることが確認された。同じPCR試験を4回繰り返して実施した。得られた電気泳動の結果はいずれも同様で、再現性良い結

果が得られた。

【0157】〔比較例2〕

〔微小ケミカルデバイスの作製〕減圧路(2')、空洞部(4')、及び脱気隔壁(4')を設けなかったこと以外は実施例2と同様にして微小ケミカルデバイス(＃C2)を作製した。

【0158】〔使用試験〕得られた微小ケミカルデバイス(＃C2)を用いて、実施例2と同様のPCR試験を行ったところ、比較例1の水試験の場合と同様の気泡の発生が見られ、得られた反応生成物の電気泳動分析の結果はいずれも濃度が異なり、その一部は極めて薄く、再現性を欠く結果であった。

【0159】〔実施例3〕

〔微小ケミカルデバイスの作製〕実施例2と同様にし、開閉バルブ(図示せず)を介して減圧手段との接続部(図示せず)を有する内径10mm、長さ50mmのシリンダー状の減圧室(図示せず)が、減圧口(12)に接続されて部材(B)表面に接着されて設けられていること以外は、実施例2と同様のPCR用微小ケミカルデバイス(＃3)を作製した。

【0160】〔PCR試験〕得られた微小ケミカルデバイス(＃3)を用いたこと、減圧室(図示せず)をシリンジにて約30kPaに減圧してバルブ(図示せず)を閉じ、減圧用シリンジを切り離した状態で試験を行ったこと以外は実施例2と同様にPCR試験を4回行った。得られた電気泳動結果は実施例2と同様であり、優れた再現性を有していた。

【0161】

〔発明の効果〕本発明は、流路内の溶液に溶解している空気を連続的に除去出来るため、室温を超える高温、特に90℃以上に加熱する反応部においても、液流路内で溶液から溶存空気が析出することがなく、液切れや反応溶液の液量変化が少なく、従って、流速や反応率の変動が少なく再現性に優れた微小ケミカルデバイス、特にマイクロリアクター、PCRデバイスを提供することがで

きる。

【0162】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例のPCR用微小ケミカルデバイスに使用した表面に凹部を有する部材(A)を表面に直角な方向から見た平面図の模式図である。

【図2】実施例のPCR用微小ケミカルデバイスに使用した部材(B)を表面に直角な方向から見た平面図の模式図である。

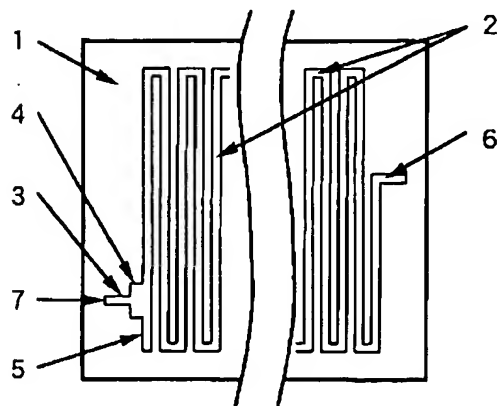
【図3】実施例1で作製したPCR用微小ケミカルデバイスの立面図の模式図である。

【図4】実施例2で作製したPCR用微小ケミカルデバイスの立面図の模式図である。

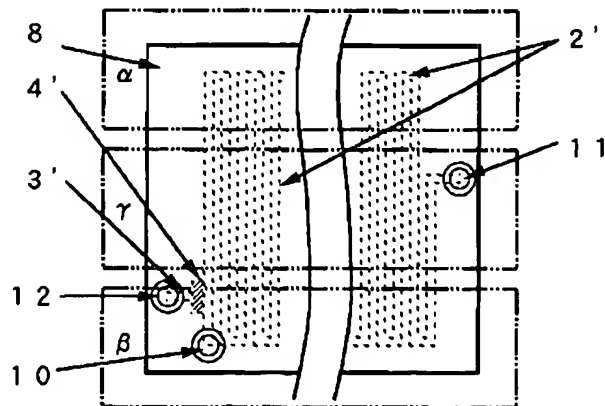
【符号の説明】

- 1 : 部材(A)
- 2 : 流路となる溝
- 2' : 流路
- 3 : 減圧路となる溝
- 3' : 減圧路
- 4 : 脱気隔壁形成部となる凹部
- 4' : 空洞、及びそこに設けられた脱気隔壁
- 5 : 導入部
- 6 : 流出部
- 7 : 減圧路の端
- 8 : ポリスチレン板
- 9 : 接着剤層
- 10 : 導入口
- 11 : 流出口
- 12 : 減圧口
- 13 : 接着剤層
- 14 : 固体状物質(C)層
- α : 95℃温調領域
- β : 45℃温調領域
- γ : 75℃温調領域

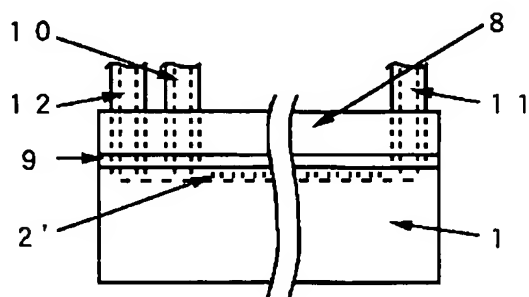
【図1】



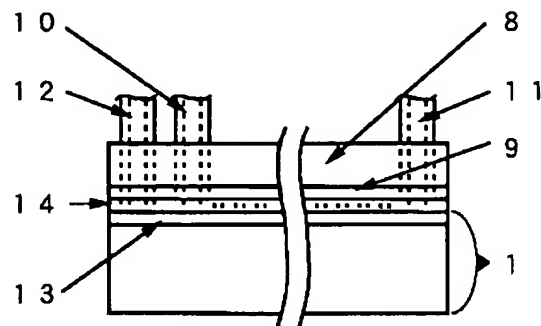
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

B 01 J 14/00

C 12 M 1/00

G 01 N 27/447

35/02

37/00

1 0 1

// C 12 Q 1/68

G 01 N 35/08

F I

B 01 J 14/00

C 12 M 1/00

G 01 N 35/02

37/00

C 12 Q 1/68

G 01 N 35/08

27/26

テームト' (参考)

D 4 G 0 7 5

A

A

1 0 1

A

A

3 0 1 C

F ターム(参考) 2G058 BA08 BB02 BB09 BB17 BB18

BB19 EB19

4B029 AA07 AA23 CC03 CC11 FA12

4B063 QQ42 QR32 QR55 QR62 QS32

4D006 GA02 GA25 GA41 HA41 JA02Z

KA12 KA31 KB30 KE06Q

MA03 MA06 MA22 MA40 MB03

MB06 MB10 MC22 MC24X

MC28 MC37 MC42 MC53 MC58

MC65 NA42 NA54 PA05 PB02

PB12 PB62 PC38 PC67 PC80

4D011 AA08 AA16 AC01

4G075 AA32 AA61 AA63 AA65 BC06

BD01 CA65 DA02 DA18 EA06

EE21 FA14 FB12 FC02